

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verpflegungseinrichtungen

Für die Untersuchung der *B. cereus*-Prävalenz im Rahmen der routinemäßigen mikrobiologischen Hygienestatuskontrollen wurden die insgesamt 183 beprobten Einrichtungen willkürlich ausgewählt. Beim Feldversuch wurden sieben Küchen ausgewählt, von denen anzunehmen war, dass die Ausgangsprävalenz in etwa bei 25% liegt.

##### 3.1.2 Probenahmestellen in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Probenahmeprotokoll: Mikrobiologische Oberflächenuntersuchungen (1999-2000)

Arbeitsfläche, PE	A= Abklatsch mittels Blut-RODAC
Arbeitsfläche, V <sub>2</sub> A	A
Aufschnittmaschine, Auffangbrett	A
Kühlraumregal	A
Kühlraumwand	A
Kühlschrankboden	A
Teller	A
Kessel, innen	A
Kippbratpfanne, innen	A
Fleischschneidebrett	A
Fleischwolfeinfüllstutzen	A
Mengmulde	A
PE-Speisenrührer	A
Geschirrhandtuch	A
Regal, Brotraum	A
Mikrowelle, Drehteller	A
Theke, Speisenausgabe	A
Kühltheke, innen	A
Schürze	A
Thermophore, Dichtung	T= Tupfer
Thermophore, Ventil	T
Besteck	T
Kesselauslass	T
Fleischwolfschnecke	T
Fleischwolf (Scheiben)	T
Fleischhaken	T
Aufschnittmaschine, Innenteil	T
Gewürzdeckel	T
Kühlschrank, Dichtung	T
Abzugshaube	T
Mehrzweckküchenmaschine	T
Spitzsieb	T
Kühlraum, Türgriff	T
Handwaschbürste	T

## Feldversuch

### Probenahmeprotokoll

<b>Probenahmestelle</b>		<i>Tego<sup>®</sup>2000</i>	<i>Wofasteril<sup>®</sup></i>
Arbeitsfläche, PE (Gemüsevorbereitung)	M		
Arbeitsfläche, V <sub>2</sub> A	M		
Arbeitsfläche, PE (Gemüsevorbereitung)	T		
Arbeitsfläche, V <sub>2</sub> A	T		
Arbeitsfläche, PE (Fleischvorbereitung)	M		
Arbeitsfläche, V <sub>2</sub> A	M		
Arbeitsfläche, PE (Fleischvorbereitung)	T		
Arbeitsfläche, V <sub>2</sub> A	T		
Kühlraumregal	M		
Kessel, innen	T		
Regal, Lagerraum	T		
Kühlschrankboden	T		
Arbeitsflächen V <sub>2</sub> A Kalte Küche	M		
Arbeitsflächen V <sub>2</sub> A Kalte Küche	T		
Arbeitsflächen PE Kalte Küche	M		
Arbeitsflächen PE Kalte Küche	T		
Hebel Seifenspender	T		
Türgriff	T		
Aufschnittmaschine, Auffangbrett	M		
Fleischwolf (Scheiben)	T		
Mehrzweckküchenmaschine	T		
Gewürzwagen	T		
Thermo, innen	T		
Mengmulde	T		
Hebel, Desinfektionsmittelspender	T		

M= MOSSEL RODAC

T= Tupfer

### **3.1.3 Nährmedien**

Folgende Fertignährmedien wurden nach Herstelleranweisung im Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Koblenz selbst hergestellt und kamen zum Einsatz:

#### **Blut-Agar**

Blut-Agar Basis: Merck, Art.Nr. 1.10886

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.):

Nährsubstrat (Herzextrakt und Pepton) 20,0

Natriumchlorid 5,0

Agar-Agar 15,0

Zusatz:

Defibriertes steriles Schafblut (70 ml pro Liter)

### **Blut-RODAC**

Blut-Agar Nr.2 (Grundsubstrat), Biologische Analysensystem GmbH, Best.-Nr. 7608

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.):

Tryptose	15,0
Sojamehlpepton	2,5
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	5,0
Agar Nr.2	12,0

Zusatz:

Defibriertes steriles Schafblut (70 ml pro Liter)

### **Casein-Sojamehlpepton-Agar**

Merck Art.Nr. 1.05458

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.):

Pepton aus Casein	15,0
Pepton aus Sojamehl	5,0
Natriumchlorid	5,0
Agar-Agar	15,0

Zusatz:

Tween 80® 30,0 , Merck, Art.Nr. 8.22187

Lecithin 3,0, Fluka, Art.Nr. 414468/1

### **Cereus-Selektivagar nach MOSSEL (1967)**

Cereus-Selektivagar-Basis, Merck, Art.Nr 1.05267

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.):

Pepton aus Casein	10,0
Fleischextrakt	1,0
D(-)-Mannit	10,0
Natriumchlorid	10,0
Phenolrot	0,025

Agar-Agar 12,0

Zusatz:

Eigelbemulsion (100 ml pro Liter)

*Bacillus cereus* Selektiv-Supplement, 2 ml Polymyxin B 50.000 iE., Merck, Art.Nr.

1.05267

### **TSB-Bouillon**

Trypton-Soya-Broth, Oxoid CM129

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.):

Caseinpepton	17,0
Sojamehlpepton	3,0
Natriumchlorid	5,0
Dikaliumhydrogenphosphat	2,5
Glucose	2,5

#### **Hirn-Herz-Bouillon**

Merck, Art.Nr. 10493

Typische Zusammensetzung (g/l):

Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt und Peptone)	27,5
D(+)-Glucose	2,0
Natriumchlorid	5,0
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5

#### **Peptonwasser (gepuffert)**

Merck, Art.Nr. 1.07228

Typische Zusammensetzung (g/l Aqua demin.):

Peptone	10,0
Natriumchlorid	5,0
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	9,0
Kaliumhydrogenphosphat	1,5

#### **3.1.4 Nährmedienträger**

Folgende Nährmedienträger wurden bei den durchgeführten Untersuchungen verwendet:

**RODAC-Platten** mit Rasterfeld (Ø innen: 5,6 cm)

Greiner Labortechnik, Best.Nr. 629161

**Petrischalen** mit Nocken, 92x16 mm, Sarstedt, Best.Nr. 821473

zur Aufnahme von Blut-, CASO- und Cereus-Selektiv-Nährmedium.

**Duran-Röhrchen** (16 mm Ø, 160 mm Länge), Schott bezogen über VWR-International, Best.Nr. 212 K 1116

**Kapsenbergkappen** bezogen über VWR-International, 16 mm Ø, Best.Nr. 391 G 0910

#### **3.1.5 Tupfer**

Als Tupfer kamen **Sterile Abstrichtupfer**, Becton Dickinson

bezogen über VWR-International, Best.Nr. 115 Q 8270 zum Einsatz.

### 3.1.6 Toxintest zur Bestimmung toxinbildender *B. cereus*-Stämme

Zur Bestimmung des Toxinbildungsvermögens von *B. cereus*-Stämmen wurde das *B. cereus* Enterotoxin (**BCET**)-RPLA-Kit, Oxoid, Art.Nr. TD950 sowie **PS-Mikrotiterplatten** 96k, U-Form, Greiner Labortechnik, Art.Nr. 650 101 genutzt.

### 3.1.7 Desinfektionsmittel und Enthemmer

Zur vergleichenden sporoziden Wirksamkeitsprüfung wurden folgende für den Lebensmittelbereich zugelassene Desinfektionsmittel ausgewählt:

**Wofasteril® E400**, KESLA Pharma Wolfen, Art.Nr. E40.5000

Zusammensetzung (100 ml):

40±3 g Peroxyessigsäure

Wasserstoffperoxid

Essigsäure

Desensibilisierende und stabilisierende Anteile

Als Pufferadditiv für das Peressigsäurepräparat Wofasteril® E400 wurde

**alcapur®**, KESLA Pharma Wolfen, Art.Nr. ALC.5000

Zusammensetzung:

Natriumhydroxid > 5%

zugemischt.

**Tego 2000®**, Goldschmidt AG, Art.Nr.

Zusammensetzung:

Mikrobizide Amphotenside

**Wasser standardisierter Härte (WSH)**, aus 10%iger Calciumchloridlösung (8,75ml), 10%iger Magnesiumsulfatlösung (2,5ml) in Aqua dest.(1650ml), pH 7,2 ±0,2. (17° Deutscher Wasserhärte).

Folgende Substanzen wurden für die Herstellung der unterschiedlichen Enthemmer benötigt.

#### Enthemmer 1

3,0% Tween 80®

Merck, Art.Nr. 8.22187

0,3% Lecithin

Fluka, Art.Nr. 414468/1

0,3% Saponin

Roth, Art.Nr. 6857.1

0,1% L-Histidin

Roth, Art.Nr. 3852.1

#### Enthemmer 2

3,0% Tween 80®

Merck, Art.Nr. 8.22187

0,3% Lecithin

Fluka, Art.Nr. 414468/1

#### Enthemmer 3

3,0% Tween 80®

Merck, Art.Nr. 8.22187

0,3% Lecithin

Fluka, Art.Nr. 414468/1

0,1% L-Histidin

Roth, Art.Nr. 3852.1

0,5% Na-Thiosulfat

Merck, Art.Nr. 6516

### 3.1.8 Keimträger

Bei den verwendeten Keimträgern handelte es sich einerseits um **Kunststoffplättchen** aus Polyethylen (PE 500). Dieser Kunststoff wird üblicherweise für Schneidunterlagen oder Bedarfsgegenstände im lebensmittelverarbeitenden Betrieben eingesetzt. **V<sub>2</sub>A-Stahlplättchen** simulierten küchenübliche Edelstahl-Oberflächen.

### 3.1.9 Laborausstattung

Zum Einsatz kamen:

- Eppendorf-Pipetten 10-100 µl und 1000 µl
- sterile Messpipetten 1 ml und 10 ml (eichfähig)
- Messbecher 1000 ml
- Duran-Flaschen 1000 ml, Schott
- sterile Pinzetten
- V<sub>2</sub>A- und PE-Keimträger, 3,3x3,3 cm
- Laborstopuhr
- Petrischalen
- Laborwaage, Sartorius, Anzeigebereich 0,01 g
- Whirlmix, IKA-Labortechnik
- Fireboy plus, Integra Biosciences
- Schüttelwasserbad (thermostatgeregelt)
- Zentrifuge, Hettich Rotixa/AP Nr. 4202
- Brutschrank 70±1°C, Heraeus Nr. B 6060
- Brutschrank 55±1°C, Heraeus Nr. B 6060
- Brutschrank 37±1°C, Memmert Nr. 3KE50
- Brutschrank 20±1°C, Memmert Nr. ICP 600
- Heißluftsterilisator, 95°C bei 10-minütiger Sterilisierzeit, Heraeus
- Agarklav, Tecnomara AG-L 10

### 3.1.10 Testkeim zur Sporozidieprüfung

Aus der Stammsammlung der Laborabteilung II des Zentralen Institutes des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Koblenz kam der *B. cereus*-Stamm Nr. 1CHOERGI, welcher ursprünglich aus einer Verpflegungseinrichtung der Bundeswehr isoliert wurde, zum Einsatz. Er wurde im Rahmen der Qualitätssicherungsmaßnahmen auf folgende Parameter geprüft: Koloniemorphologie und Hämolyse auf Blutagar, Koloniemorphologie, Polymyxinresistenz, Hydrolyse von Lecithin auf *Cereus*-Selektivagar nach MOSSEL (1967), Gram-Verhalten sowie Zellform, Katalase, Oxidase, Voges-Proskauer-Reaktion, Nitratreduktion, Fermentation von Mannitol, Hydrolyse von Stärke, Verstoffwechslung von Glykogen, Toxintest mittels (BCET)-RPLA-Kit. Aufgrund der Reaktionen wurde der Keim als *B. cereus* identifiziert.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mikrobiologische Oberflächenuntersuchungen

In den Jahren 1999 und 2000 wurden mikrobiologische Oberflächenuntersuchungen in 183 Verpflegungseinrichtungen der ehemaligen Wehrbereiche III und IV (Nordrhein-Westfalen, Hessen, Rheinland-Pfalz, Saarland) durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurden mittels nicht destruktiver Verfahren (RODAC-Platten, Stieltupfer) Proben von Oberflächen vor Ort gewonnen und im Labor hinsichtlich des Vorkommens von *B. cereus* untersucht.

Die Probenahme erfolgte grundsätzlich von optisch sauberen, trockenen und intakten Oberflächen. Mittels **RODAC-Platten** bestehend aus Standard-Nähragar mit 7% Schafblutzusatz wurden hauptsächlich die Arbeitsflächen (V<sub>2</sub>A-Tische, PE-Schneidbretter) sowie abklatschgeeignete Küchengerätschaften beprobt. Die Nährmedien wiesen zur Probennahme Raumtemperatur auf. Nach Entfernen des Deckels ist die Agarfläche etwa fünf Sekunden mit mäßigem Druck (optimal 200g/Platte) auf die zu untersuchende Oberfläche gedrückt worden. Anschließend wurde der Deckel aufgesetzt und die Platten mit dem Deckel nach oben transportiert. Des Weiteren erfolgte die Beprobung nicht abklatschgeeigneter Gerätschaften über eine Fläche von ca. 100 cm<sup>2</sup> mittels **Stieltupfer** im der vereinfachten Naß-Tupfertechnik (LOUWERS u. KLEIN, 1994a, LOUWERS et al., 1997) unter Verwendung nur eines angefeuchteten Tupfers. Die Fläche wurde hierzu mittels einer Folienschablone fixiert. Vor der Beprobung von den trockenen Oberflächen wurde der Tupfer kurz in das Transportmedium eingetaucht und leicht am Innenrand des Transportmediumgefäßes abgestreift. Der Tupfer ist unter Drehen mäanderförmig über die zu untersuchende Fläche geführt und anschließend im Transportmedium versenkt worden. Der Transport der RODAC-Platten und Tupfer zum Labor erfolgte in Kühlboxen mit anschließendem Verbringen in die entsprechenden Brutschränke. Die Inkubation der Platten erfolgte über 48±2 Stunden bei 37±1°C. Dann wurde das Keimwachstum geprüft und zur Bestätigung verdächtige Kolonien mit der Öse abgenommen und auf *Cereus*-Selektivagar nach MOSSEL (Mannit-Eigelb-Polymyxin-Agar) ausgestrichen. Die Tupfer wurden im Transportmedium (9 ml TSB-Bouillon) 24±2 Stunden bei 37±1°C vorbebrütet. Anschließend erfolgte der Ausstrich wie oben beschrieben auf Selektivmedium.

Bei einem Teil der *B. cereus*-Isolate kam ein **Testkit zur Toxinbestimmung** (BCET-RPLA) zum Einsatz. Verdächtige Kolonien wurden dabei mit einem sterilen Wattetupfer von der Nährbodenplatte abgehoben, in ein Reagenzglas mit Hirn-Herz-Bouillon überführt und bei 37±1°C für 18-24 Stunden im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Röhren bei 4°C und 900 x g für 20 Minuten. Die so aufbereiteten Kulturen wurden wie folgt in die Mikrotiter<sup>®</sup>-Platten überführt: Je Probe wurden zwei Reihen mit acht Vertiefungen benötigt. Mit Ausnahme der ersten Vertiefung jeder Reihe werden in

alle Kavitäten 25 µl der Verdünnungslösung vorgelegt. In die erste und zweite Vertiefung jeder Reihe wurden 25 µl des Probenextraktes pipettiert. Nach gutem Durchmischen durch mindestens zehnmaliges Aufsaugen und Ablaufenlassen mittels Pipette wurde eine Verdünnungsreihe 1:1 bis zur einschließlich 7. Kavität erstellt. In der achten Kavität jeder Reihe waren 25 µl Verdünnungslösung als Negativkontrolle vorgelegt. In alle Kavitäten der ersten Reihe wurden je 25 µl sensibilisiertes Latextestreagenz (beladen mit anti-Enterotoxin Immunglobulinen vom Kaninchen) und in alle Kavitäten der zweiten Reihe je 25 µl nicht sensibilisiertes Latexkontrollreagenz pipettiert. Im Anschluß wurde die Mikrotiter<sup>®</sup>-Platte mit Haftklebefolie verschlossen und für eine gleichmäßige Durchmischung leicht geschüttelt. Lichtgeschützt und erschütterungsfrei wurde die Platte bei Raumtemperatur für 20 bis 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung der Titration erfolgt gegen einen schwarzen Hintergrund. Eine **positive** Reaktion zeigte sich in Form einer rosaroten, wolkig-trüben Suspension, die gleichmäßig in der Kavität verteilt war. Bei einem **negativen** Reaktionsergebnis bildete sich ein kompaktes, punktförmiges Sediment, das etwas kräftiger rosarot gefärbt war.

### **3.2.2 Prüfung der Wirkung verschiedener Desinfektionsmittel mittels Suspensions-tests**

Das überwiegend in den Küchen der Bundeswehr eingesetzte Flächendesinfektionsmittel Tego 2000<sup>®</sup> (Amphotensid) wurde auf seine Wirksamkeit gegenüber *B. cereus*-Sporen getestet. Bei diesen Versuchen kam alternativ ein Desinfektionsmittel (Wofasteril<sup>®</sup> E400) auf Peressigsäure-Basis zum Einsatz. Wofasteril<sup>®</sup> E400 wurde ausgewählt, da nach Angaben des Herstellers in Kombination mit alcapur<sup>®</sup> (Natriumhydroxid) die negativen Wirkungen sporozider Desinfektionsmittel (geringe Personal- und Materialverträglichkeit) stark abgeschwächt sind. Wofasteril<sup>®</sup> E400 wurde wie auch Tego 2000<sup>®</sup> von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG, 1999) für den Lebensmittelbereich geprüft und als wirksam befunden. In die aktuelle 6. Desinfektionsmittelliste der DVG für den Lebensmittelbereich (DVG, 2003) ist das Kombinationsverfahren Wofasteril<sup>®</sup> E400 / alcapur<sup>®</sup> nunmehr aufgenommen. Die Testung der Desinfektionsmittel erfolgte in Anlehnung an die Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel (DVG, 2000).

Als Testkeim kam der toxinbildende *B. cereus*-Stamm Nr. 1CHOERGI aus der Stammsammlung des Institutes zum Einsatz. Zur Herstellung einer Sporensuspension erfolgte die Inkubation nach Ösenausstrich auf Casein-Sojamehlpepton-Agar (CASO) bei 37°C über 10 Tage. Der gebildete Bakterienrasen wurde nachfolgend mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und in ein Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension 3-mal gewaschen und 30 min bei 70±1°C erhitzt, um verbliebene vegetative Zellen abzutöten.

Der **Verdünnungstest** diente der Bestimmung der bakteriostatischen Wirkung der Desinfektionsmittel, die mit der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) beschrieben wird. Gleichzeitig erfolgte die Auswahl geeigneter Inaktivierungssubstanzen (Enthemmer). Folgende Enthemmer wurden ausgetestet: 3,0 % Tween 80<sup>®</sup>, 0,3 % Lecithin, 3,0 % Saponin, 0,1 % Histidin (Enthemmer 1), 3,0 % Tween 80<sup>®</sup>, 0,3 % Lecithin (Enthemmer 2), 3,0 % Tween 80<sup>®</sup>, 0,3 % Lecithin, 0,1 % Histidin, 0,5 % Na-Thiosulfat (Enthemmer 3). Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe des zu testenden Desinfektionsmittels wurde diese zu gleichen Teilen mit doppelt konzentrierter TSB-Bouillon vermischt und mit 1 ml der Sporensuspension, die eine Keimzahl von etwa  $1,0 \times 10^7$  KbE/ml aufwies, beimpft. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C über 72 h. Die MHK ist definiert als höchste Desinfektionsmittelverdünnung, die das Keimwachstum noch unterdrückt. Sie wurde anhand einer visuellen Auswertung durch Trübung der Bouillon ermittelt. Im **qualitativen Suspensionstest** (Abb. 5) wirkten die Desinfektionsmittel in verschiedenen Konzentrationen über unterschiedliche Zeiträume (5, 15, 30 und 60 Minuten) auf *B. cereus*-Sporen (ca.  $1,0 \times 10^6$  KbE/ml) ein. Bei konstanter Testtemperatur von  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  konnte durch Inokulation von 0,1 ml der Reaktionsgemische in TSB-Bouillon mit Enthemmer und Überprüfung des Angehens der Kulturen dargestellt werden, ob annähernd alle im Reaktionsgefäß enthaltenen Sporen abgetötet wurden. Zur Prüfung des sog. „Eiweißfehlers“ für den Lebensmittelbereich erfolgte jeweils ein paralleler Ansatz unter Zusatz von 10 % sterilem Rinderserum, welches unmittelbar vor Inokulation der Sporensuspension in das Reaktionsgemisch zugegeben wurde. Die Auswertung der qualitativen Suspensionstests erfolgte nach einer Inkubation der Kulturröhrchen bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 72 Stunden. Als „+“ wurde Wachstum im Kulturröhrchen kenntlich gemacht, mit „-“ wurden Kulturröhrchen ohne Wachstum bezeichnet. Zur Absicherung konnten in Reaktionsgrenzbereich bei Bedarf Subkulturen auf CASO-Agar angelegt werden.

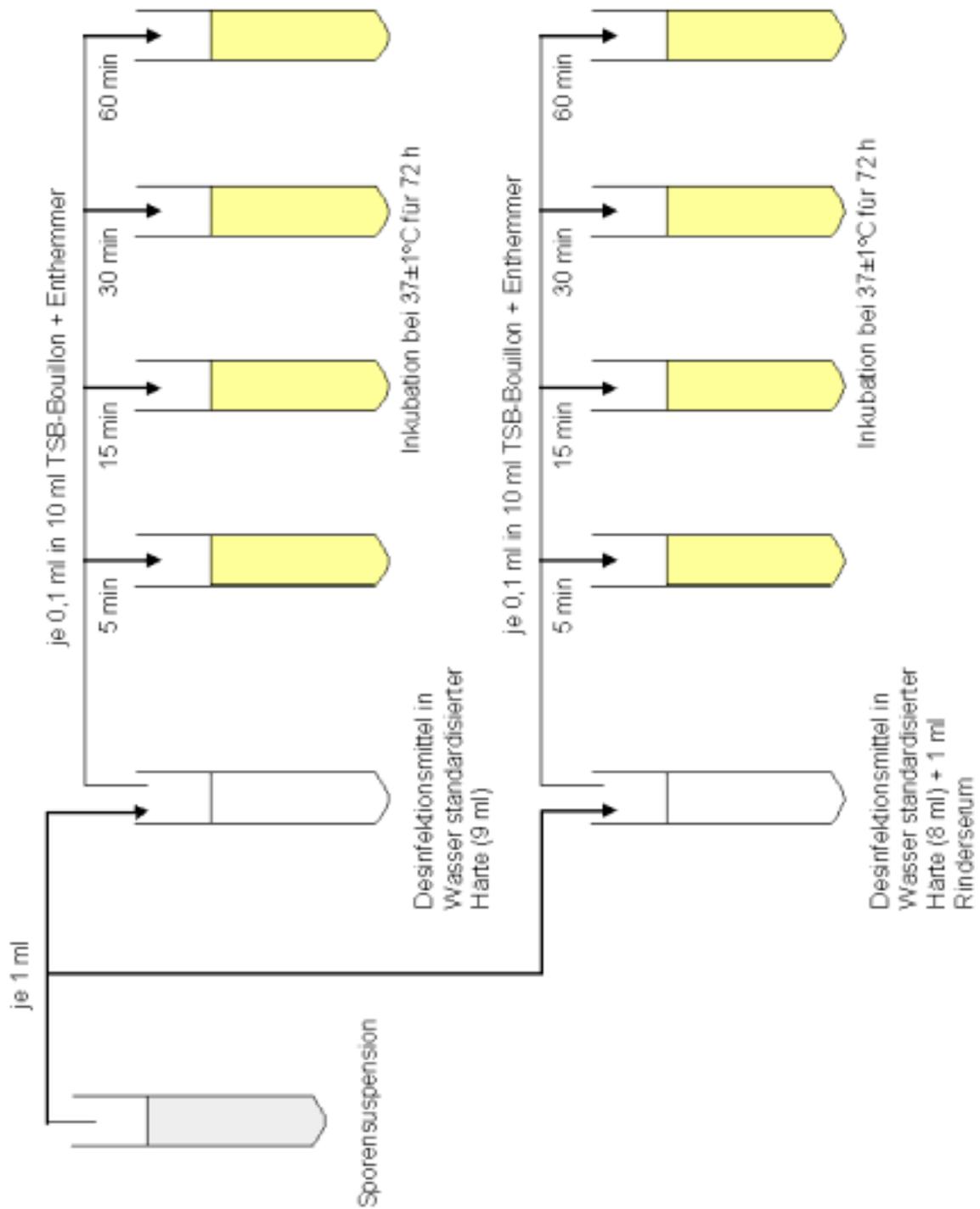


Abb.5: Qualitativer Suspensionstest zur Bestimmung der sporoziden Wirkung nach der Endpunktmethode der DVG (modifiziert nach DVG, 2000)

Beim **quantitativen Suspensionstest** wurde die sporozide Wirkung durch die Reduktion der Keimzahl infolge der Einwirkung des Desinfektionsmittels bei konstanter Testtemperatur von  $20\pm 1^\circ\text{C}$  nachgewiesen (Abb. 6). Auch hier wirkten verschiedene Konzentrationen der Desinfektionsmittel in einem Reaktionsgefäß auf Sporen von *B. cereus* (Ausgangskeimzahl: ca.  $4,0 \times 10^5$  KbE/ml) ein. Als Kontrolle wurde anstatt des Desinfektionsmittels 9ml Wasser standardisierter Härte (WSH) eingesetzt und das Wachstum des Teststammes somit überprüft. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde die Keimzahl im Tropfplattenverfahren nach der *Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren*, § 35 LMBG (L06.00-19), in der Suspension ermittelt, wobei in der Erstverdünnung (mit Enthemmer) eine Inaktivierung des Desinfektionsmittels über 30 min erfolgte. Die zur Keimzählung verwendeten CASO-Platten wurden 48 Stunden bei  $37\pm 1^\circ\text{C}$  bebrütet, die Koloniezahlen ausgezählt und das gewichtete arithmetische Mittel berechnet. Bei der Auswertung wurde der Reduktionsfaktor (RF) ermittelt. Er berechnete sich aus der Ausgangskeimzahl im Reaktionsgefäß abzüglich der gewachsenen Keimzahl aus der jeweiligen Desinfektionsmittelverdünnung und wurde als dekadischer Logarithmus ( $\lg$  KbE) angegeben.



### 3.2.3 Prüfung der Wirkung verschiedener Desinfektionsmittel mittels Keimträgertests

Im **Keimträgertest** wurden 3,3 x 3,3 cm große Plättchen aus V<sub>2</sub>A-Stahl bzw. PE als Keimträger verwendet. Beide Materialien werden in den Küchen der Bundeswehr häufig verwendet. Die Vorgehensweise für die Herstellung der Suspension aus *Bacillus cereus*-Sporen entsprach der in Kap. 3.2.2 vorgestellten Methode.

Nach dem Autoklavieren der Keimträger für 10 min bei 95 °C wurden jeweils 50 µl der Sporensuspension (Ausgangskeimzahl:  $5,9 \times 10^7$  KbE/ml) auf ihre Oberfläche pipettiert und das Inokulat für 45 Minuten bei  $55 \pm 1^\circ\text{C}$  im Brutschrank getrocknet. Nach Verdunstung des Wassers waren die zurückgebliebenen Festbestandteile (Sporen, Kochsalz) als weißer Belag auf den Keimträgern sichtbar, der anschließend mit jeweils 200 µl der zu testenden Desinfektionsmittelverdünnung überschichtet wurde. Die Einwirkzeit betrug bei konstanter Temperatur von  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  30 min. Makroskopisch war eine Ablösung des Belages von den Keimträgern nicht zu beobachten. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Keimträger während der Wartezeiten für Trocknung und Einwirkung des Desinfektionsmittels in geschlossenen Petrischalen aufbewahrt.

Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden die Keimträger mittels steriler Pinzetten in der Petrischale erfasst und die Sporen inklusive des Desinfektionsmittels mit 10 ml einer enthemmerhaltigen TSB-Bouillon fraktioniert abgespült. Um möglichst alle Sporen mit der Bouillon in die Petrischale zu überführen, wurden die Keimträger zwischen den Spülungen mit sterilen Wattetupfern abgerieben. Nachfolgend wurde die Bouillon zusammen mit dem Tupfer in sterile Reagenzgläser überführt und eine Minute maschinell geschüttelt, um die vermehrt am Tupfer haftenden Sporen abzuschwemmen und gleichmäßig zu verteilen. Nach einer Wartezeit von 30 min zur Inaktivierung des Desinfektionsmittels durch den in der Bouillon enthaltenen Enthemmer wurde die Anzahl (total) vermehrungsfähiger Keime in der Bouillon ermittelt. Die Keimzählungen erfolgten hier ebenfalls im Tropfplattenverfahren nach der *Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren*, § 35 LMBG (Abb. 7).

Bei den Untersuchungen wurden zwei **Kontrollen** mitgeführt. Zum einen wurden 50 µl der Sporensuspension direkt in die enthemmerhaltige TSB-Bouillon überführt (Kontrolle 2), zum anderen wurden auf den Keimträgern angetrocknete Sporen mit 200 µl steriler physiologischer Kochsalzlösung überschichtet (Kontrolle 1) und nach 30 min Wartezeit mittels des beschriebenen Tupferverfahrens wiedergewonnen. Nur bei ausreichend hoher Wiederfindungsrate können die für die Beurteilung der Desinfektionsmittelwirkung notwendigen Reduktionsfaktoren gewährleistet werden. Bei der Auswertung wurde der Reduktionsfaktor (RF) ermittelt. Er berechnete sich aus der Keimzahl ermittelt durch die Kontrolle 1 abzüglich der Keimzahl nach Einwirkung der jeweiligen Desinfektionsmittelverdünnung und wurde als dekadischer Logarithmus (lg KbE) angegeben.

Die methodenimmanente Verlustrate, die durch die Keimzahl der Kontrolle 2 abzüglich der Keimzahl aus Kontrolle 1 in lg KBE dargestellt wird, muss möglichst konstant sein.

Darüber hinaus sollte die Streuung der Ergebnisse, welche aus dem Vergleich der Werte von Testansatz A und B ersichtlich ist, annehmbar sein.

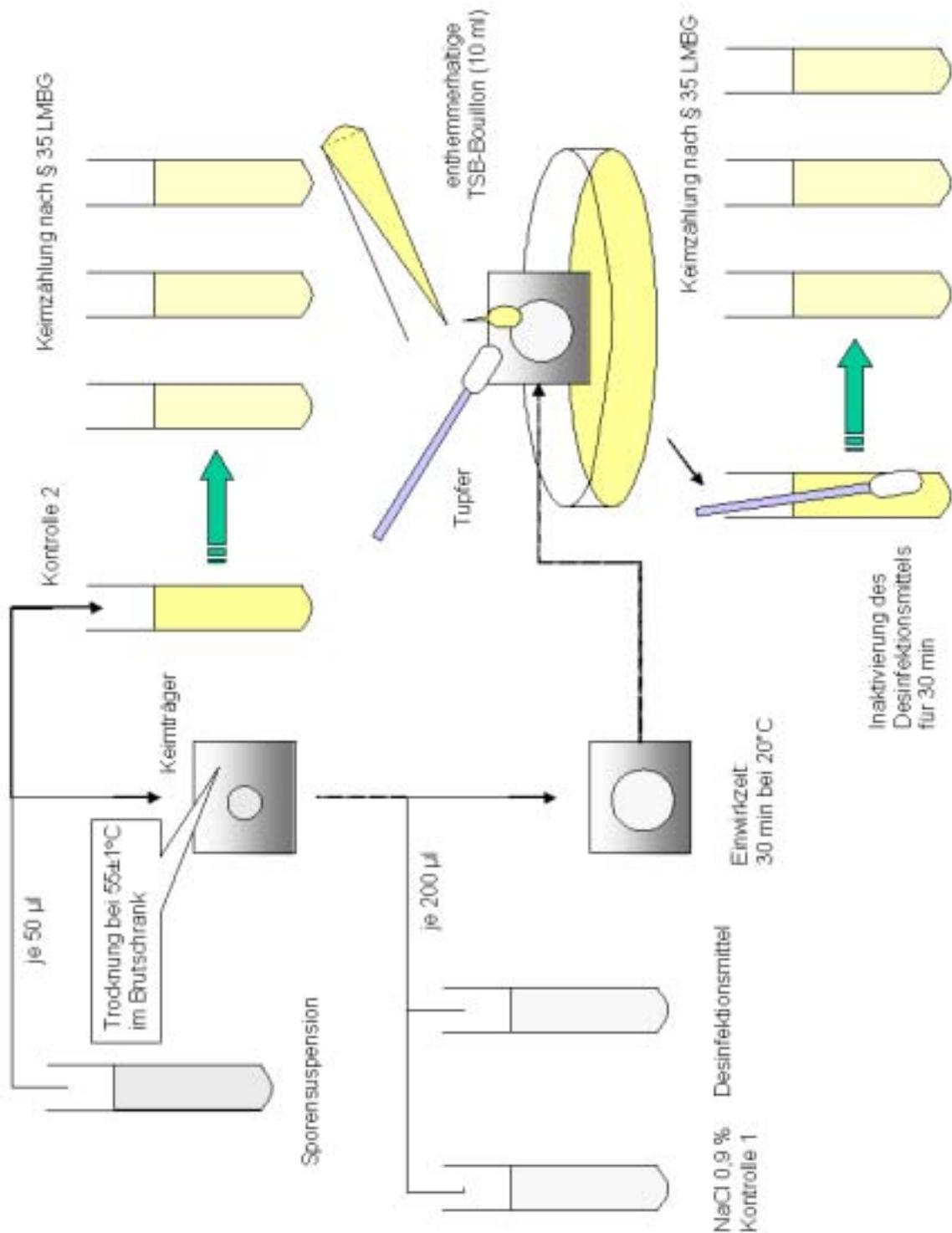


Abb.7: Keimträgertest zur Bestimmung der sporoziden Wirkung von Desinfektionsmitteln

### 3.2.4 Feldversuch in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Für die Auswahl der für die Feldstudie geeigneten Verpflegungseinrichtungen zur Wirksamkeitsprüfung der in den Laboruntersuchungen getesteten Desinfektionsmitteln unter Praxisbedingungen war zunächst abzuklären, welche *B. cereus*-Prävalenz auf den Oberflächen und Bedarfgegenständen der beteiligten Einrichtungen angenommen werden kann. Dazu sind im Vorfeld 186 Proben aus routinemäßigen mikrobiologischen Hygienestatuskontrollen in belasteten Verpflegungseinrichtungen im Hinblick auf das Vorkommen von *B. cereus* ausgewertet worden. Um einen Einfluss von Infrastruktur, Personal, Management und anderen spezifischen Faktoren einzelner Küchen auszuschließen, ist eine **geeignete Anzahl von beteiligten Verpflegungseinrichtungen** festgelegt worden. In den ausgewählten sieben Einrichtungen kann von einer *B. cereus*-Ausgangsprävalenz von 22% ausgegangen werden. Die Küchen sind wie folgt zu charakterisieren:

- Küche A: durchschnittlich 30 Verpflegungsteilnehmer/Tag, Neubau, Ordnungsprinzip der Trennung nach reinen und unreinen Bereichen punktuell nicht eingehalten, Transportwege nicht kreuzungsfrei, Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände neuwertig, Lage in einer größeren Stadt
- Küche B: durchschnittlich 900 Verpflegungsteilnehmer/Tag, Altbau, sanierungsbedürftig, Ordnungsprinzip der Trennung nach reinen und unreinen Bereichen eingehalten, Transportwege verhältnismäßig lang (Betriebsräume über 2 Etagen verteilt) und nicht kreuzungsfrei, Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände entsprechen größtenteils den Anforderungen, Lage in einer größeren Stadt
- Küche C: durchschnittlich 30 Verpflegungsteilnehmer/Tag, Altbau, Ordnungsprinzip der Trennung nach reinen und unreinen Bereichen eingehalten, Transportwege nicht kreuzungsfrei, Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände neuwertig, Lage in einer größeren Stadt
- Küche D: durchschnittlich 50 Verpflegungsteilnehmer/Tag, Altbau, Ordnungsprinzip der Trennung nach reinen und unreinen Bereichen punktuell nicht eingehalten, Transportwege nicht kreuzungsfrei, Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände neuwertig, Lage in ländlicher Gegend
- Küche E: durchschnittlich 500 Verpflegungsteilnehmer/Tag, sanierungsbedürftig, Ordnungsprinzip der Trennung nach reinen und unreinen Bereichen eingehalten, Transportwege kreuzungsfrei, Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände neuwertig, Lage in ländlicher Gegend
- Küche F: durchschnittlich 30 Verpflegungsteilnehmer/Tag, Neubau, Ordnungsprinzip der Trennung nach reinen und unreinen Bereichen punktuell nicht eingehalten, Transportwege nicht kreuzungsfrei, Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände neuwertig, Lage in einer mittelgroßen Stadt
- Küche G: durchschnittlich 600 Verpflegungsteilnehmer/Tag, Neubau, Ordnungsprinzip der Trennung nach reinen und unreinen Bereichen eingehalten, Transportwege kreuzungsfrei, Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände neuwertig, Lage in einer mittelgroßen Stadt

Zur Erzielung statistisch aussagekräftiger Ergebnisse, wurde bei der Planung der Feldstudie unter Berücksichtigung der Ausgangsprävalenz zunächst der vermutete **Unterschied der Desinfektionsmittelwirkung** der beiden Präparate abgeschätzt. Anhand der Ergebnisse aus den Suspensionstests sowie den praxisnahen Untersuchungen mittels Keimträgern ist für Tego 2000® keine Wirkung und für Wofasteril E400® / alcapur® eine Reduktion der Ausgangsprävalenz auf 10% *B. cereus*-positiver Proben veranschlagt worden. Die **Anzahl der zu ziehenden Proben** konnte anhand dieser Daten auf 50 Proben pro Verpflegungseinrichtung und Desinfektionsverfahren festgelegt werden. Dabei wurden jeweils 25 für alle Küchen gleichermaßen festgelegte Probenahmestellen pro Desinfektionsverfahren vor Beginn der Desinfektionsmaßnahme mittels MOSSEL-RODAC oder Stieltupfern beprobt, um die tatsächliche Ausgangsprävalenz in die Auswertung einbeziehen zu können. Von diesen Flächen und Gerätschaften sind nach Ende der Einwirkzeit des Desinfektionsmittels, dem Klarspülen und Lufttrocknen wiederum Proben von den gleichen 25 Probenahmestellen gezogen worden. Grundlage für die **Auswahl der Probenahmestellen** war eine Pärchenbildung für die beiden Testansätze, d.h. für jede Probenahmestelle, die später einem Desinfektionsverfahren unterzogen wird, gibt es eine im Hinblick auf die vermutete Ausgangsprävalenz vergleichbare Probenahmestelle für das alternative Desinfektionsverfahren. Beispielsweise wurden zwei Kunststoffarbeitsflächen mittels Stieltupfer beprobt, die im Gemüsevorbereitungsraum aufgrund gleicher Umweltbedingungen wahrscheinlich der gleichen Kontamination ausgesetzt waren. Diese beiden Flächen sind dann den unterschiedlichen Desinfektionsverfahren unterzogen worden (Fläche A= Tego 2000®, Fläche B= Wofasteril E400® / alcapur®) und anschließend mit der gleichen Entnahmemethode nach Desinfektion beprobt worden. Die Desinfektionsmaßnahmen sind in allen beteiligten Einrichtungen durch eingewiesenes Personal des Zentralen Institutes des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Koblenz durchgeführt worden, damit ein personalbedingter Fehler in der Durchführung von vorne herein ausgeschlossen werden konnte.

Mittels RODAC-Platten nach MOSSEL (1967) wurden die Arbeitsflächen und Regale sowie andere Küchengerätschaften beprobt. Nicht abklatschgeeignete Gerätschaften sind über eine Fläche von ca. 100 cm<sup>2</sup> mittels Stieltupfer beprobt worden. Die jeweilige Zuordnung der Probenahmestellen zu den beiden Probenentnahmemethoden ist aus dem Probenahmeprotokoll (s. Kap. 3.1.2) ersichtlich. Die RODAC-Platten und Tupfer wurden in Kühlboxen bei 8±1°C zum Labor transportiert und unmittelbar zur Bebrütung in die entsprechenden Brutschränke verbracht. Die Inkubation der RODAC-Platten erfolgte über 24±2 Stunden bei 37±1°C. Dann wurde das Keimwachstum geprüft, verdächtige Kolonien mit der Öse abgenommen und auf Blutagar ausgestrichen. Nach einer weiteren Inkubation über 24±2 Stunden bei 37±1°C wurde die hämolytische Aktivität beurteilt. Die Tupfer wurden

im Transportmedium (9 ml TSB-Bouillon) 24±2 Stunden bei 37±1°C vorbebrütet. Anschließend erfolgte der Ausstrich auf Cereus-Selektivagar nach MOSSEL (1967) und die Identifizierung verdächtiger Kolonien wie oben beschrieben.

Bei allen *B. cereus*-Isolaten kam der BCET-RPLA-Testkit zur Toxinbestimmung zum Einsatz. Die Testdurchführung ist unter Punkt 3.2.1 (Mikrobiologische Oberflächenuntersuchungen) beschrieben. Die Auswertung der gezogenen Proben erfolgte auf der Basis von *B. cereus*-**presence/absence**.

### 3.2.5 Statistische Auswertung des Feldversuches

Zur **Auswertung des Feldversuches** wurden aus den Ergebnissen ein Merkmal ‚Unterschied vor/nach Desinfektion‘ je Desinfektionsmittel gebildet, das für jede Kombination von Probenahmepunkt und Probenahmetechnik folgende Information enthält:

- + + oder - - = keine Veränderung
- + - = vorher positiv, nachher negativ
- + = vorher negativ, nachher positiv.

Damit wurde zuerst eine tabellarische Gegenüberstellung (Crosstabulation) für die beiden Desinfektionsmittel erstellt, in der die Anzahl der Probenahmepunkt/Probenahmetechnik-Kombinationen zu sehen war, bei denen Tego 2000® und Wofasteril E400® / alcapur® dieselbe Wirkung (auf der Hauptdiagonalen) bzw. unterschiedlich Wirkungen hatten. Im oberen rechten Dreieck der Crosstabulation findet sich die Anzahl der Merkmale, bei denen bei Wofasteril E400® / alcapur® das günstigere Ergebnis, im unteren linken Dreieck die Anzahl, die bei Tego 2000® das günstigere Ergebnis ergaben. Zur Bewertung, ob die in der Studiengruppe vorgefundenen Merkmale asymmetrisch sind, ist der  $\chi^2$ -Test nach McNemar (SACHS, 2002) genutzt worden. Die Symmetrie-Hypothese konnte abgelehnt werden, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit (auch p-Wert genannt) beim McNemar-Test unterhalb des vorgegebenen Grenzwertes lag (5%=0.05). Der p-Wert gab die Wahrscheinlichkeit an, mit der das vorliegende Stichprobenergebnis zu erwarten wäre, wenn die Symmetrie-Hypothese tatsächlich gelten sollte. Die berechnete **Relative Effektivität (RE)** von Wofasteril® E400/ alcapur® gegenüber Tego 2000® ergab sich aus der Anzahl *B.cereus*-positiver Proben nach Anwendung von Tego 2000® im Verhältnis zur Anzahl positiver Proben nach Wofasteril® E400/ alcapur®-Anwendung. Bei der **RE I** wurde die Ausgangsprävalenz nicht berücksichtigt, da die Annahme einer gleichen Prävalenz der zu desinfizierenden Flächen und Gegenstände der Planung der Studie zugrunde lag. Die **RE II** wurde definiert als der Vergleichsfaktor zwischen den *B. cereus*-positiven Proben des Tego 2000®-Ansatzes und des Ansatzes mit Wofasteril® E400 / alcapur® unter Berücksichtigung der tatsächlichen Ausgangsprävalenz. Im Falle einer vollständigen Rückführung der *B. cereus*-Prävalenz (keine *B. cereus*-positiven Proben) nach Desinfektion wird bei der Division die Null durch Eins ersetzt und das Ergebnis mit größer als (>) angegeben.